

12.06.00

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 1月31日

02000815

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-022640

出 願 人
Applicant (s):

住友金属工業株式会社

REC'D 27 JUL 2000	
WIPO	PCT

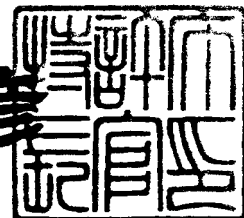
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3054144

【書類名】 特許願

【整理番号】 1991646

【提出日】 平成12年 1月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C30B 29/54

B01D 9/02

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市扶桑町1番8号 住友金属工業株式会社エ
レクトロニクス技術研究所内

【氏名】 三城 明

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市扶桑町1番8号 住友金属工業株式会社エ
レクトロニクス技術研究所内

【氏名】 秋岡 幸司

【特許出願人】

【識別番号】 000002118

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友金属工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064746

【弁理士】

【氏名又は名称】 深見 久郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100085132

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 俊雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100083703

【弁理士】

【氏名又は名称】 仲村 義平

【選任した代理人】

【識別番号】 100099922

【弁理士】

【氏名又は名称】 甲田 一幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008693

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 結晶調製用装置、結晶調製方法および該装置用キット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 溶液中に含まれる高分子の結晶を調製するための装置であつて、

複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第 1 の部材、および

前記溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面をそれぞれ有する複数の第 2 の部材を備え、

前記第 1 の部材の複数の貫通孔をふさぐように、前記第 1 の部材と前記複数の第 2 の部材とが組合されており、

前記複数の貫通孔および前記複数の第 2 の部材により、前記溶液を保持するための部分が複数形成されており、かつ

前記溶液を保持するための複数の部分においてそれぞれ、前記互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面が前記溶液に同時に接触できるように配置されていることを特徴とする、結晶調製用装置。

【請求項 2】 前記複数の第 2 の部材間で、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面の組合せが異なっていることを特徴とする、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】 前記複数種の表面のいずれかに、前記高分子をより強く静電的に吸着させるようになっており、

前記複数種の表面は、所定の領域において互いに隣合うよう配置され、かつ

前記所定の領域において、前記高分子をより強く静電的に吸着させる表面が占める面積は、残りの表面が占める面積以下であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の装置。

【請求項 4】 前記高分子をより強く静電的に吸着させる表面が、不純物添加されたシリコン、金属酸化物および金属水酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも 1 つの材料からなり、かつ

前記残りの表面が、シリコン、不純物添加されたシリコンおよびシリコン酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも 1 つの材料からなることを特徴とする、請

求項 3 に記載の装置。

【請求項 5】 前記高分子がタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 6】 溶液中に含まれる高分子の結晶を調製するための装置であって、

複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第 1 の部材、および

前記溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面を組合せた領域を複数種有する第 2 の部材を備え、

前記第 1 の部材の複数の貫通孔をふさぐように、前記第 1 の部材と前記第 2 の部材とが組合されており、

前記複数の貫通孔および前記第 2 の部材により、前記溶液を保持するための部分が複数形成されており、

前記溶液を保持するための複数の部分においてそれぞれ、前記互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面が前記溶液に同時に接触できるように配置されており、かつ

前記溶液を保持するための複数の部分間で、前記互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面の組合せが異なっていることを特徴とする、結晶調製用装置。

【請求項 7】 前記複数種の表面を組合せた領域が、基板の一主表面上に、互いに離れて複数設けられており、

前記複数の領域の配置に対応するよう、前記複数の貫通孔が前記第 1 の部材において配置されていることを特徴とする、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 8】 前記複数種の表面のいずれかに、前記高分子をより強く静電的に吸着させるようになっており、

前記複数種の表面は、前記領域において互いに隣合うよう配置され、かつ

前記領域において、前記高分子をより強く静電的に吸着させる表面が占める面積は、残りの表面が占める面積以下であることを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の装置。

【請求項 9】 前記高分子をより強く静電的に吸着させる表面が、不純物添

加されたシリコン、金属酸化物および金属水酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも1つの材料からなり、かつ

前記残りの表面が、シリコン、不純物添加されたシリコンおよびシリコン酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも1つの材料からなることを特徴とする、請求項8に記載の装置。

【請求項10】 前記高分子がタンパク質であることを特徴とする、請求項6～9のいずれか1項に記載の装置

【請求項11】 溶液中に含まれる帯電した高分子の結晶を前記溶液から調製する方法であって、

前記高分子を含みかつ前記高分子の等電点以外のpHを有する溶液を、請求項1～10のいずれか1項に記載される装置の前記溶液を保持するための複数の部分にそれぞれ入れて前記複数種の表面に接触させる工程、および

前記複数種の表面のいずれかの上で前記高分子の結晶が成長するように、前記接触を維持する工程を備えることを特徴とする、結晶調製方法。

【請求項12】 前記溶液を保持するための複数の部分の少なくとも1つにおいて、前記高分子を含む溶液のpHは、前記複数種の表面の1つに前記高分子と逆の極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであり、かつ他の表面に前記高分子と同じ極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであることを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 請求項1～5に記載の結晶調製用装置のためのキットであって、

複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第1の部材、および

前記溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面をそれぞれ有する複数の第2の部材を備えることを特徴とする、キット。

【請求項14】 請求項6～10に記載の結晶調製用装置のためのキットであって、

複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第1の部材、および

前記溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面を組合せた領域を複数種有する第2の部材を備えることを特徴とする、キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高分子の結晶を調製するための装置、方法および該装置用キットに関し、特に、タンパク質、酵素等の種々の生体高分子、およびそれらの複合体を含む高分子の結晶化に適用される装置、方法およびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

タンパク質等の生体高分子の結晶化では、通常は無機塩等の低分子量化合物の場合と同様、高分子を含む水溶液または非水溶液から溶媒を奪う処理を施すことにより、過飽和状態にして、結晶を成長させるのが基本となっている。このための代表的な方法として、バッチ法、透析法および気液相間拡散法があり、これらは、試料の種類、量、性質等によって使い分けられている。

【0003】

図1(a)および図1(b)は、蒸気拡散法により種々の条件下で結晶化を試みるための装置を示す。装置1は多数のウェル2を有し、そこにおいて、各ウェル2および各プレート3により、結晶化のためのセル4が構成される。各ウェル2には、沈殿剤5が保持され、一方、ウェル2の開口をふさぐ各プレート3上では結晶化すべき生体高分子を含む母液6が垂下される。この装置では、沈殿剤5および母液6中の揮発成分の蒸発によって、平衡が成立する。この装置を使用したスクリーニングは、通常、沈殿剤の濃度や種類、タンパク質溶液の濃度、緩衝溶液のpHや種類などを変えることによって行われる。しかし、この装置において、多くの条件を調製することは骨の折れる作業であり、また、試みるべき条件は多い。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

X線結晶構造解析により生体高分子の3次元構造を決定するためには、目的とする物質を抽出・精製後、結晶化することが必須となる。しかし、現在のところ、どの物質に対しても適用すれば必ず結晶化できるといった手法および装置がな

いため、勘と経験に頼ったトライアンドエラーを繰返しながらか結晶化を進めているのが実状である。生体高分子の結晶を得るためには、非常に多くの実験条件による探索が必要であり、結晶成長がX線結晶解析の分野での最も大きなボトルネックとなっている。特に、溶液のpH、イオン強度、温度、緩衝剤の種類、比誘電率等に応じて、生体高分子表面での電荷分布や該分子のコンフォーメーションは顕著に変わるため、結晶化に適当な条件を見出すことは非常に骨の折れる作業となっている。

【0005】

本発明の目的は、上記問題を解決すべく、結晶化に適した条件を容易に見出し得る技術を提供することである。

【0006】

特に、本発明の目的は、種々の高分子の結晶化または凝集化に適した条件をより短い時間でもたらし得る新規なスクリーニング装置およびスクリーニング法を提供することである。

【0007】

本発明のさらなる目的は、X線構造解析を可能にし得る大型の結晶をもたらすことができる装置および方法を提供することである。

【0008】

本発明のさらなる目的は、少量の生体高分子溶液で、結晶化を可能にするための技術を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明により、溶液中に含まれる高分子の結晶を調製するための装置が提供され、該装置は、複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第1の部材、および該溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面をそれぞれ有する複数の第2の部材を備える。該装置において、第1の部材の複数の貫通孔をふさぐように、第1の部材と複数の第2の部材とが組合されており、かつ複数の貫通孔および複数の第2の部材により、該溶液を保持するための部分が複数形成されている。該溶液を保持するための複数の部分においてそれぞれ、互いに

異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面が該溶液に同時に接触できるように配置されている。

【0010】

本発明による装置において、複数の第2の部材間で、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面の組合せは、異なってもよい。本発明の好ましい態様において、複数種の表面のいずれかに、高分子をより強く静電的に吸着させるようになっており、複数種の表面は、所定の領域において互いに隣合うよう配置され、かつ所定の領域において、高分子をより強く静電的に吸着させる表面が占める面積は、残りの表面が占める面積以下である。高分子をより強く静電的に吸着させる表面は、不純物添加されたシリコン、金属酸化物および金属水酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも1つの材料からなることができる。一方、残りの表面は、シリコン、不純物添加されたシリコンおよびシリコン酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも1つの材料からなることができる。本発明による装置は、タンパク質等の生体高分子の結晶化に特に有用である。

【0011】

本発明により、溶液に含まれる高分子の結晶を調製するためのもう1つの装置が提供され、該装置は、複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第1の部材、および該溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面を組合せた領域を複数種有する第2の部材を備える。該装置において、第1の部材の複数の貫通孔をふさぐように、第1の部材と第2の部材とが組合せられており、かつ複数の貫通孔および第2の部材により、該溶液を保持するための部分が複数形成されている。該溶液を保持するための複数の部分においてそれぞれ、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面が該溶液に同時に接触できるように配置されている。該溶液を保持するための複数の部分間で、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面の組合せは、異なっている。すなわち、第2の部材において、複数種の表面が組合せられた領域は、複数種存在する。

【0012】

本発明の一具体例において、複数種の表面を組合せた領域は、基板の一主表面

上に、互いに離れて複数設けられており、かつ複数の領域の配置に対応するよう、複数の貫通孔が第 1 の部材において配置されている。本発明の好ましい態様において、複数種の表面のいずれかに、高分子をより強く静電的に吸着させるようになり、複数種の表面は、該領域において互いに隣合うよう配置され、かつ該領域において、高分子をより強く静電的に吸着させる表面が占める面積は、残りの表面が占める面積以下である。高分子をより強く静電的に吸着させる表面は、不純物添加されたシリコン、金属酸化物および金属水酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも 1 つの材料からなることができる。一方、残りの表面は、シリコン、不純物添加されたシリコンおよびシリコン酸化物よりなる群から選ばれた少なくとも 1 つの材料からなることができる。本発明による装置は、タンパク質等の生体高分子の結晶化に特に有用である。

【 0 0 1 3 】

本発明により、溶液に含まれる帯電した高分子の結晶を前記溶液から調製する方法が提供され、該方法は、高分子を含みかつ高分子の等電点以外の pH を有する溶液を、上記装置の溶液を保持するための複数の部分にそれぞれ入れて該複数種の表面に接触させる工程、および複数種の表面のいずれかの上で高分子の結晶が成長するよう、該接触を維持する工程を備える。この方法において、溶液を保持する装置は、必要に応じて沈殿剤とともに、密閉された場所に置かれてもよい。好ましくは、溶液を保持するための複数の部分の少なくとも 1 つにおいて、高分子を含む溶液の pH は、複数種の表面の 1 つに高分子と逆の極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであり、かつ他の表面に高分子と同じ極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものである。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明による装置のための 1 つのキットが提供され、該キットは、複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第 1 の部材、および溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面をそれぞれ有する複数の第 2 の部材を備える。

【 0 0 1 5 】

また、本発明による装置のためのもう 1 つのキットが提供され、該キットは、

複数の貫通孔が互いに離れて設けられている第1の部材、および溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面を組合せた領域を複数種有する第2の部材を備える。

【0016】

【発明の実施の形態】

タンパク質を初めとする生体高分子のほとんどは、溶液内において幾何学的に特異的な構造および静電的な相互作用（静電斥力・引力、ファンデルワールス力）によって分子間同士の認識が行なわれている。静電的なエネルギーに基づく分子間の相互作用においては、個々の分子最表面でのわずかな空間的な電荷分布の相違が、分子間の認識度合い、分子集合体の作りやすさに決定的な影響を及ぼすことが予想される。したがって、溶液内をブラウン運動しながら衝突を繰返している個々の分子では、周期的かつ規則的な構造を有する分子集合体の核が非常に形成されにくいと考えられる。さらに、結晶核が形成された場合でも、各分子の表面構造や電荷分布が同一でなく、冗長であれば、核の周囲に集合する分子は互いに緩く結合し、その結果、結晶性が低下し得る。

【0017】

タンパク質分子の結晶生成に関しては、その核生成の初期過程が重要であるとの報告がなされている。結晶化の初期過程において核となる分子を2次元的に配列させる何らかの条件が整えば、その後の結晶化は、これを核としてエピタキシャル的に進行するものと考えられる。

【0018】

本発明による装置および方法は以下に説明するような作用機構に基づき、高分子の選択的吸着を行ない、その結果、特定の領域に結晶核が形成され、好ましい結晶成長をもたらすことができる。

【0019】

図2は、本発明による装置において、結晶化操作に使用される部分の一例を示す。結晶化部材10は、第1の表面11aを有する第1の固体11、および第2の表面12aを有する第2の固体12を有する。図に示すように、第2の固体12は、第1の固体11上に形成された凸部またはアイランドとすることができる。

。第 1 の固体 1 1 と第 2 の固体 1 2 は、実質的に異なる材料からなってもよいし、共通する主材料を有してもよい。ここで、「実質的に異なる」とは、固体を構成する主材料が異なっていることを意味する。両者の固体が共通する主材料を含む場合、一般に、不純物、微量成分等の副材料の量または種類が互いに異なっている。固体を構成する材料は、たとえば金属、半導体、またはそれらの化合物、たとえば酸化物、水酸化物、窒化物等である。部材 1 0 は、タンパク質等の結晶化すべき高分子 1 3 を含む溶液 1 4 と接触させられる。タンパク質等の高分子 1 3 の表面は、分子全体をマクロ的に見た場合、その分子の等電点以外の pH を有する溶液において、通常、正または負に帯電している。一方、部材 1 0 において、上述した材料の表面 1 1 a および 1 2 a も、溶液 1 4 中で帯電する。このとき、表面についての電位の大きさおよび極性は、固体の材質および溶液の pH に依存する。たとえば、ある pH の溶液中で、固体表面 1 1 a は負に帯電し、固体表面 1 2 a は正に帯電する。一方、高分子 1 3 は、当該 pH の溶液中で負に帯電する。この場合、溶液 1 4 中の高分子 1 3 は、高分子 1 3 と逆の極性で帯電する固体表面 1 2 a に静電的な引力に従って選択的に吸着される。高分子 1 3 と同じ極性で帯電する固体表面 1 1 a への吸着は、静電作用により阻害される。こうして、固体表面 1 2 a 上で高分子 1 3 の結晶核が形成され、結晶化が進められる。しかし、必ずしも第 1 の表面と第 2 の表面とが溶液中で逆の極性を示す必要はない。第 1 および第 2 の表面が同じ極性の電荷を帯びていてもその電荷量が異なれば、そのいずれかにより強く高分子を引き寄せ、吸着させることができる。このように、固体表面の静電的性質を制御しておけば、タンパク質等の高分子を特異的または優先的に吸着あるいは凝集させ得る表面が与えられる。また、固体表面への静電的吸着によって、溶液内の対流の影響を低減し、安定した結晶成長をもたらすことができる。

【 0 0 2 0 】

上述したように、本発明の具体的態様において、基板表面に形成された 1 つの溶液接触領域には、溶液中で表面電位（ゼータ電位）が異なる複数種の表面が形成されている。この溶液接触領域において、ある 1 種の表面が該領域の大部分の面積を占め、その他の表面が占める面積の割合は小さいことが望ましい。例えば

、溶液接触領域に第 1 の表面と第 2 の表面の 2 種類の表面が形成されている場合、第 1 の表面が占める面積が第 2 の表面が占める面積に較べ十分に大きいことが望ましい。

【 0 0 2 1 】

本発明による装置において、結晶化部材のため、所望の表面電位を有し、かつ溶液中で安定な任意の材料を使用できる。そのような材料は、ドーピングによって表面電位の制御が可能なシリコン等の半導体材料の他、電解質溶液中で表面水酸基が生成され、この水酸基の解離により所望の表面電荷をもたらす得る金属または半導体の酸化物または水酸化物、同様に表面電荷をもたらす得る他の無機化合物、および有機高分子などの有機化合物を含む。本発明において、結晶化部材を構成する材料は、以下に説明するメカニズムを考慮して選択することができる。

【 0 0 2 2 】

一般に、タンパク質分子、コロイド粒子、ならびに金属、半導体、およびそれらの酸化物、水酸化物または窒化物などの化合物の表面は、水溶液中で、その溶液の pH 値によって定まる表面電位（一般にゼータ電位として測定できる）に帯電する。この表面電位が見かけ上ゼロになるときの溶液の pH 値が、等電点である。等電点は物質によって異なるが、この等電点より低い pH において物質は正に帯電し、等電点より高い pH において物質は負に帯電する。本発明は、このような物質の性質を利用して、高分子の選択的結晶化を行なう。たとえば、図 3 に示すような関係が複数の固体表面とタンパク質との間に成立するとする。曲線 S_1 は、第 1 の固体表面についての表面電位と pH との関係を表し、曲線 S_2 は、第 2 の固体表面（凸部表面）についての表面電位と pH との関係を表し、曲線 P は、タンパク質の表面電位と pH との関係を表す。第 1 の固体表面の等電点は 3、タンパク質の等電点は 6、第 2 の固体表面の等電点は 9 である。したがって、斜線で示す領域の pH （タンパク質の等電点と第 2 の固体表面の等電点の間の pH ）を有する溶液において、第 1 の固体表面およびタンパク質は負に帯電し、第 2 の固体表面は正に帯電する。この pH 領域において、タンパク質は、第 2 の固体表面に静電引力により選択的に吸着または固定され、その結果、第 2 の固体表面

でタンパク質の結晶成長が促進され得る。一方、タンパク質と第1の固体表面との間には、静電斥力が働く。一方、図4に示すような関係が成立するとする。この場合、第1の固体表面の等電点は9、タンパク質の等電点は6、第2の固体表面（凸部表面）の等電点は3である。そして、第2の固体表面の等電点とタンパク質の等電点の間のpHを有する溶液において、第1の固体表面およびタンパク質は正に帯電し、第2の固体表面は負に帯電する。したがって、斜線に示す領域のpHにおいて、静電引力により、タンパク質を第2の固体表面に選択的に吸着させることができる。このように、母液のpHを適当な値に設定することで、アイランド表面に選択的に分子を静電吸着させ、その結果、その表面に結晶核を形成させて、分子の結晶成長を起こさせることができる。

【0023】

たとえば、酸化シリコン (SiO_2) の等電点は1.8~2.8であり、したがって、それより低いpHにおいて SiO_2 は正に帯電し、それより高いpHにおいて負に帯電する。一方、アルミナ ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) の等電点は9付近である（なお、 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ の等電点は7.4~8.6程度である）。また、ほとんどのタンパク質は4~7の等電点を有する（たとえば、ヒト血清アルブミン4.7~5.2、ウシインスリン5.3~5.8、インターフェロン（ニワトリ胚）7~8、ヒト成長ホルモン4.9~5.2）。したがって、たとえば、図2に示す部材において、第1の固体11を SiO_2 とし、第2の固体12をアルミナとすれば、タンパク質を含み、かつ6~8のpH（タンパク質の等電点とアルミナの等電点の間の値）を有する溶液14中で、 SiO_2 表面は負に帯電し、アルミナ表面は正に帯電する。一方、4~7の等電点を有するタンパク質は、通常、負に帯電する。したがって、溶液中のタンパク質は、正に帯電するアルミナ表面に選択的に吸着され得る。一方、タンパク質の SiO_2 表面上への吸着は阻害され得る。このように、 SiO_2 とアルミナとの組合わせは、選択的吸着に対し適当である。

【0024】

また、シリコン (Si) の等電点は添加されている不純物の種類や濃度によって異なるが、たとえば、一般的なn型Siの等電点は3.5~4程度であり、そ

れより低い pH において n 型 Si 表面は正に帯電し、それより高い pH において負に帯電する。また、一般的な p 型 Si の等電点は 5 ～ 6 程度である。したがって、図 2 に示す部材において、第 1 の固体 1 1 を n 型 Si 基板とし、第 2 の固体 1 2 を Si 基板上に形成されたアルミナとすれば、タンパク質を含み、かつ 6 ～ 8 の pH (タンパク質の等電点とアルミナの等電点の間の値) を有する溶液 1 4 中で、n 型 Si 表面とタンパク質は負に、アルミナ表面は正に帯電する。したがって、溶液中のタンパク質は、正に帯電するアルミナ表面に選択的に吸着する一方で、負に帯電する Si 表面上への吸着は阻害され得る。このように、シリコンとアルミナとの組合わせも、タンパク質分子の選択的吸着に対し適当である。

【 0 0 2 5 】

本発明による装置において、第 1 の固体表面と第 2 の固体表面との組合わせは、任意であるが、結晶化すべき分子の等電点が、第 1 の固体表面の等電点と第 2 の固体表面の等電点との間にくるよう、当該組合わせを選択することが望ましい。すなわち、図 3 および図 4 に示すように、結晶化すべき分子の pH - 表面電位曲線が、第 1 の固体表面と第 2 の固体表面の pH - 表面電位曲線の間にくることが望ましい。

【 0 0 2 6 】

本発明による装置に使用される好ましい半導体には、シリコン、ガリウム・ヒ素 (GaAs)、ガリウム・リン (GaP) などがある。好ましい半導体化合物には、酸化シリコン、窒化シリコンなどがあり、好ましい金属化合物には、酸化アルミニウム (α - Al_2O_3 、 γ - Al_2O_3)、酸化チタン、酸化銅などの金属酸化物や、窒化アルミニウム、窒化チタン、窒化タンゲステン、窒化タンタル、TaSiN、WSiN などの金属窒化物や、水酸化アルミニウム、水酸化マグネシウムなどの金属水酸化物などがある。好ましい組合わせには、シリコン-アルミナ、酸化シリコン-アルミナ、窒化シリコン (等電点は 4 ～ 5 程度) - アルミナ、酸化シリコン-酸化チタン (等電点は 5 ～ 6.5 程度)、シリコン-酸化チタン、酸化チタン-アルミナなどがある。参考として、図 5 に、アルミナ、p 型シリコン、窒化ケイ素、n 型シリコンおよび酸化シリコンの表面電位 (測定値としてはゼータ電位) の pH 依存性を示す。

【 0 0 2 7 】

第 1 の表面および第 2 の表面は、同一の基板上に形成することが好ましく、半導体基板上に形成することがより好ましく、特に、シリコン基板上に形成することが好ましい。たとえば、シリコン基板表面の所定の領域にのみアルミナを形成することで、シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。また、シリコン基板表面全体にシリコン酸化膜 (SiO_2 膜) を形成し、その SiO_2 膜表面の所定の領域にのみアルミナを形成することで、酸化シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。 SiO_2 膜に変えてシリコン窒化膜 (Si_3N_4 膜) を形成すれば、同様に窒化シリコン-アルミナの組合わせが形成でき、アルミナの代わりに酸化チタンを形成すれば、シリコン-酸化チタンや酸化シリコン-酸化チタンの組合わせを形成できる。

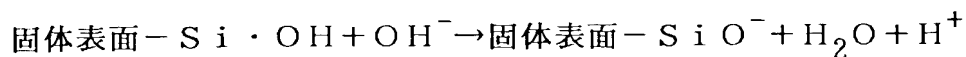
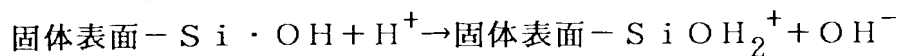
【 0 0 2 8 】

半導体基板、より好ましくはシリコン基板を用いることで、CVD、ホトリソグラフィ、エッチング等の通常の半導体集積回路の製造と同様な手法によって、容易に複数種の表面を有する装置を作製できる。すなわち、CVD技術を用いてシリコン基板上に所望の材料の膜を成膜し、必要に応じてその上に異なる材料の膜を成膜して多層構造とし、ホトリソグラフィ技術を用いて所望の形状のマスクを形成し、エッチング技術を用いてマスクを施した領域以外を除去して下地を露出させれば、各種の組合わせの複数種の固体表面を有する装置を作製できる。たとえば、シリコン基板の表面にアルミナ膜を成膜し、所定の領域のみを残して当該アルミナ膜をエッチングにより除去してシリコン基板の表面を露出させれば、シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。また、シリコン基板表面にシリコン酸化膜を成膜し、さらにその上にアルミナ膜を成膜し、所定の領域のみを残してアルミナ膜をエッチングにより除去しシリコン酸化膜を露出させれば、酸化シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。このように、シリコン基板上に成膜する膜の材料を変えれば、容易に各種の組合わせが形成できる。

【 0 0 2 9 】

金属もしくは半導体の酸化物または水酸化物の表面は、水と接すると水和を起こし、水酸基を生成させる。この水酸基の解離により、酸化物または水酸化物の

表面は、水溶液の pH に応じて表面電位（ゼータ電位）を生じさせる。たとえば、 SiO_2 では次のような解離が生じる。



したがって、酸化物または水酸化物の表面は、低い pH で、プロトン付加により正の電位を帯び、高い pH で、OH 基からのプロトンの引き抜きにより負の電位を帯びる。一般に、酸化物または水酸化物は、見かけ上の電位がゼロになる点（等電位点）を有し、この点より高い pH では、負の表面電位を、この点より低い pH では、正の表面電位を有する。したがって、異なる等電位点を有する酸化物または水酸化物の組合わせを選択し、本発明に好ましく用いることができる。

【0030】

本発明による装置において、1つの表面は、アイランド（凸部）上に与えることができる。このアイランド部は任意の形状とすることができる。たとえば、アイランド部は、図6（a）または（b）に示すように、断面が略矩形の細長い直方体または断面が略台形の細長い角錐台の形状を有してもよいし、図6（c）に示すように、略円筒形でもよいし、図6（d）に示すような角柱形でもよい。アイランド部において高分子を吸着すべき表面32a～dは、その上で高分子の結晶がはみ出して成長するような幅dを有することが好ましい。すなわち幅dは得べき結晶の径よりも小さいことが好ましい。また、図7（a）に示すように同じ形状のアイランドを複数設けてもよいし、図7（b）に示すように、制限された範囲において幅の異なる複数種のアイランドを設けてもよい。目的とする高分子の性質により、また溶液の pH や濃度や温度などにより、結晶化に必要な吸着力と成長した結晶の取り出し易さとの兼ね合いで、適切なアイランド幅が異なることも考えられるが、幅の異なる複数種のアイランドを用意することにより、そのいずれかのアイランドで良好に結晶成長が行われ、かつ成長した結晶を容易に取り出せることが期待できる。

【0031】

また、本発明による装置において、結晶化を抑制すべき固体表面（第1の表面とする）と結晶化を促進すべきアイランド表面（第2の表面とする）の配置パタ

ーンは、任意である。たとえば、図 8 (a) に示すように、第 2 の表面 4 2 a が第 1 の表面 4 1 a に囲まれるような配置は好ましく使用される。この場合、第 1 の表面は、第 2 の表面より顕著に広い。図 8 (a) に示すもののほか、図 8 (b) に示すように、第 1 の表面 4 1 b に対し、所定の幅を有する複数の第 2 の表面 4 2 b を所定の間隔をあけて配置してもよいし、図 8 (c) に示すように、第 1 の表面 4 1 c に対し、所定の形状および面積を有する第 2 の表面 4 2 c を、所定の間隔をあけてマトリクス状に配置してもよい。

【 0 0 3 2 】

また、図 9 に示すように第 1 の表面 6 1 に対し、これと異なる複数種の第 2 の表面 6 2 および 6 3 を配置することができる。表面 6 2 および 6 3 は、所定の pH を有する溶液に対し、異なる電位を有する。たとえば、表面 6 1 は酸化シリコンとし、表面 6 2 はアルミナとし、表面 6 3 は酸化チタンとすることができる。結晶化すべき特定の高分子は、表面 6 2 および 6 3 のいずれかにより強く吸着され得る。高分子をより強く吸着させ得る表面の最適な材料は、目的とする高分子により異なることが考えられる。図 9 に示すように第 2 の表面を複数種形成することにより、1 つの装置で各種の高分子の結晶化に利用できる装置を提供できる。図 9 の装置では、第 2 の表面は 2 種類であるが、3 種以上形成することもできる。このような装置も同様に半導体集積回路の一般的な製造方法を用いて容易に作製可能である。たとえば、シリコン基板上に SiO_2 膜、 TiO_2 膜、 Al_2O_3 膜を順に成膜、積層して、表面 6 2 および 6 3 の領域を残して Al_2O_3 膜を除去して下地の TiO_2 膜を露出させ、その後、露出した TiO_2 膜のうち表面 6 3 の領域を残して TiO_2 膜を除去して SiO_2 膜を露出させればよい。

【 0 0 3 3 】

目的とする高分子の等電点、溶液の pH と高分子の表面電位（ゼータ電位）との関係など、結晶化に重要な情報が明らかでない場合も多い。このような場合、溶液の pH をいくらにすればよいのか、第 1 の表面と第 2 の表面をどのような材料の組合せで形成すればよいのか、はっきりしない。そこで、本発明は、同時に複数の条件下で結晶調製実験を行うことを可能にし、結晶化に最適な条件を探索するスクリーニングに適した装置を提供する。複数の条件を同時に設定するため

、本発明による装置は、上述したような複数種の表面を有する部材を複数有するか、あるいは、結晶化部材において、複数種の表面の組合せを複数種有する。そして、本発明は、複数の結晶化部材または複数種の結晶化領域を有する部材と、複数の貫通孔を有する部材とを組合せることにより、簡単な構造で、多数の条件を同時にスクリーニングできる装置を提供する。本発明による装置では、多数の条件のいずれかで、好ましい結晶成長が起こり得る。

【0034】

図10(a)および図10(b)に本発明による装置の好ましい具体例を示す。結晶調製用装置70は、第1の基板71と、5つの第2の基板72との組立体である。第1の基板71は、互いに離れて配置された25の円筒状貫通孔73を有する。貫通孔73が配列された各位置に、基板72が配置される。貫通孔73の1つの開口は、基板72によってふさがれ、他の開口は、開けられたままである。基板72によってふさがれた貫通孔73は、結晶化すべき材料を含む溶液を保持する部分74を形成する。各溶液保持部74は、結晶化テストのためのウェルとなる。基板72は、図11(a)および(b)に示すような形状を有する。基板72は、1つの凸部75が2つの凹部76に挟まれた領域77を5つ有する。領域77は、貫通孔73の配列に対応して、配列されている。後述するとおり、凸部75の表面と凹部76の表面とは、材質が異なり、そのため、両表面は、部分74において保持すべき溶液に対し、異なる表面電位（ゼータ電位）を有する。また、凸部75の先端の表面は、それを挟む2つの凹部76の表面より、顕著に狭くなっている。図12に示すように、結晶化すべき高分子を含む溶液78は、部分74に保持される。この時、凸部75の表面と凹部76の表面は、同時に溶液78に接触し、そして、両表面は、異なるゼータ電位を溶液78中で示し、上述したような高分子の選択的吸着を可能にする。すなわち、高分子をより強く静電的に吸着させ該高分子の結晶を成長させる表面を第2の表面と呼び、該高分子の吸着を阻害し、結晶化を抑制すべき表面を第1の表面と呼ぶと、凸部75の表面が第2の表面、凹部76が第1の表面として機能する。

【0035】

図10に示す装置において、5つの基板72は、すべて同じであってもよいし

、そのうちのいくつかが異なってもよいし、すべて異なってもよい。たとえば、5つの基板は、図13(a)～(e)に示すような構造のいずれかを有することができる。図13(a)では、p型シリコン基板81上に n^+ ドープ層82が形成されており、したがって、凸部の頂上の表面は n^+ ドープされたシリコンからなり、凹部の表面はp型シリコンからなる。図13(b)では、n型シリコン基板83上に p^+ ドープ層84が形成されており、したがって、凸部の頂上の表面は p^+ ドープされたシリコンからなり、凹部の表面はn型シリコンからなる。図13(c)では、p型シリコン基板81上に n^+ ドープ層82が形成されており、さらにその上に酸化シリコン層85が形成されており、したがって、凸部の頂上の表面は酸化シリコンからなり、凹部の表面はp型シリコンからなる。この場合、 n^+ ドープ層82がなくともよい。図13(d)では、p型シリコン基板81上に酸化シリコン層85が形成されており、さらにその上に窒化シリコン層86が形成されており、したがって、凸部の頂上の表面は窒化シリコンからなり、凹部の表面はp型シリコンからなる。シリコン基板上に直接窒化シリコン層を形成すると剥がれやすいので、層の密着性を向上させるため、酸化シリコン層を形成している。図13(e)では、p型シリコン基板81上に酸化シリコン層85が形成されており、さらにその上にアルミナ層87が形成されており、したがって、凸部の頂上の表面はアルミナからなり、凹部の表面はp型シリコンからなる。この場合も、アルミナ層の密着性を向上させるため酸化シリコン層を下地として与えている。また、アルミナ層87を陽極酸化法によって形成する場合、酸化シリコン層85は、底部に残るアルミニウム膜とシリコン基板とを絶縁する役割も果たす。図13(a)～(e)に示すような構造は、図14(a)～(c)に示すような工程に従って形成することができる。まず、図14(a)に示すように、基板91上に、基板91と導電型の異なる層、酸化シリコン層、窒化シリコン層、アルミナ層などの必要な層92を形成する。次いで、適当なマスクを使用するホトリソグラフィ法により、図14(b)に示すとおり、層92上にレジストパターン93を形成する。次いで、エッチング、アッシング等を経て、図14(c)に示すような構造を得る。このように、異なる表面電位が組合された領域は、シリコン基板表面に必要な層を形成し、エッチングすることにより、

容易に得ることができる。

【0036】

また、複数の貫通孔を有する基板（第1の基板）と組合せるべき、結晶化用の基板（第2の基板）は、上述の例の他に図15（a）～（e）のいずれかの構造を有することもできる。図15（a）では、基板121上に凸部またはアイランド122が形成される。たとえば、基板121は、シリコンであり、凸部122は酸化シリコンである。また、凸部全体を同じ材料で形成しなくともよい。例えば、図15（b）では、基板121上に形成される凸部またはアイランド123は、下地層123aと上層123bを有する。たとえば、基板121はシリコンであり、下地層123aは酸化シリコンであり、上層123（b）はアルミナ、窒化シリコン等である。基板との密着性が悪い材料は、基板との密着性のよい中間層を介して積層するのが好ましい。図15（c）では、基板121上に他の材料の層124が形成され、その上に凸部またはアイランド125が形成される。この場合、層124の表面（第1の表面）と、凸部125の頂上表面（第2の表面）が、選択的結晶化に寄与する。たとえば、基板121はシリコンであり、層124は酸化シリコンであり、凸部125の上層126はアルミナ、窒化シリコン等である。基板上に必ずしも凸部を形成する必要はない。図15（d）では、基板121上に他の材料の層124が形成され、層124の中に、それと異なる層127が形成される。層124の表面（第1の表面）と層127の表面（第2の表面）は、同一平面上にある。たとえば、基板121はシリコン、層124は酸化シリコン、層127はアルミナ、窒化シリコン等である。図15（e）では、基板121に溝または孔128が形成され、その底部に他の材料層129が形成されている。このように凹部に結晶化のための領域を設けてもよい。しかし、特定の表面（第2の表面）上に成長させた結晶を壊さずに容易に取り出すためには、結晶が当該表面に接触する面積が小さい方がよく、この点を考慮すると、結晶のサイズよりも小さい幅の表面を有する凸部またはアイランドが好ましい。なお、第2の基板をその断面が図15（a）～（e）に示されるような構造とした場合、上述の例と同様に図16（a）にその平面図を示すように、第2の表面は互いに隔離させて複数（図16（a）においては5つ）形成することができる。

そして、図 1 6 (b) に示すように第 1 の基板と接合することにより、上述の例と同様に結晶調製装置が作製される。なお、図 1 5 (d) に示されるように第 1 の表面と第 2 の表面が同一平面上にある構造の第 2 の基板の場合は、第 2 の表面は必ずしも互いに隔離して複数形成する必要はなく、長手方向に連続した形状に形成してもよい。連続した形状であっても第 1 の基板と接合した際に、貫通孔によって自動的に隔離される。

【0037】

また、貫通孔を有する基板と組合せるべき、5 つの結晶化用基板として、次のようなものを使用してもよい。(1) 第 1 の表面が p 型シリコンで、第 2 の表面がアルミナである基板、(2) 第 1 の表面が p 型シリコンで、第 2 の表面が酸化シリコンである基板、(3) 第 1 の表面 p 型シリコンで、第 2 の表面が窒化シリコンである基板、(4) 第 1 の表面が酸化シリコンで、第 2 の表面が窒化シリコンであるの基板、および (5) 第 1 の表面が酸化シリコンで、第 2 の表面がアルミナであるの基板。これらの基板において、凸部の上面を第 2 の表面とし、凸部に隣接するその他の表面を第 1 の表面とすることができる。

【0038】

本発明によれば、貫通孔を有する基板(第 1 の基板)と、結晶化用基板(第 2 の基板)との組み合わせを変えて、目的に応じ、各種の結晶調製用装置を容易に作製できる。たとえば、図 1 0 に示すような装置に関し、上記 5 種類の第 2 の基板を 1 枚ずつ使用してもよいし、5 種類のいずれかを複数枚使用してもよい。種類により枚数が異なってもよい。例えば、2 種類を何枚かずつ使用してもよいし、1 種類のみを複数枚使用してもよい。第 2 の基板は複数枚使用されるが、第 1 の基板のすべての貫通孔をふさがなくてもよい。第 1 の基板と組合せるべき第 2 の基板を適宜選択することにより、目的に応じた結晶調製用装置を容易に作製できる。

【0039】

本発明において、1 枚の第 2 の基板には、複数の結晶化領域が形成されていることが好ましい。例えば、図 1 1 に示す例では、基板に 5 つの結晶化領域が形成されている。図 1 1 に示す基板の 5 つの結晶化領域は、同じ構造を有する。しか

し、第 2 の基板に形成される複数の結晶化領域は、異なる構造を有してもよい。すなわち、本発明において、複数種の表面の組合せは、複数の結晶化領域間で同じであっても、異なってもよい。図 1 0 に示す装置では、2 5 の結晶化用ウェルを提供する。従って、この装置の場合、最大で 2 5 種類（たとえば、5 種類の結晶化領域の構造（複数種の表面の組合せが異なる 5 種類の第 2 の基板）× 5 種類のタンパク質溶液の条件）の異なる条件下で同時に結晶化が行える。しかし、必ずしも全てのウェルを異なる条件にしなくてもよい。2 5 のウェルのうち、結晶化領域の構造が同じ複数のウェル（同一または同じ種類の第 2 の基板上のウェル）では、p H、溶解するタンパク質の濃度等の条件を変えて、異なる条件下で結晶化を行うことができる。また、複数種のタンパク質溶液を、結晶化領域の構造が同じ複数のウェルにそれぞれ供給してもよい。たとえば、条件が異なる 5 種類のタンパク質溶液を供給できる。一方、結晶化領域の構造が異なる複数のウェル（異なる種類の第 2 の基板上のウェル）は、はじめから、異なる結晶化条件を提供する。構造が異なる複数のウェルには、同じ p H、または同じ濃度のタンパク質を供給することができる。

【0 0 4 0】

図 1 1 の基板のように、1 つの結晶化領域に 1 つの凸部表面（第 2 の表面）が与えられてもよいし、図 1 7（a）および（b）ならびに図 1 8（a）および（b）に示すように、1 つの結晶化領域に複数または複数種の凸部表面（第 2 の表面）が与えられてもよい。図 1 7（a）および（b）では、1 つの結晶化領域 1 3 0 に 4 つの離別した凸部表面 1 3 2 a ~ 1 3 2 d が与えられる。4 つの表面 1 3 2 a ~ 1 3 2 d は、同じものであってもよいし、異なってもよい。図 1 8（a）および（b）では、1 つの結晶化領域 1 4 0 に 2 つの離別した凸部表面 1 4 2 a および 1 4 2 b が与えられる。2 つの表面 1 4 2 a および 1 4 2 b は、同じものであってもよいし、異なってもよい。表面 1 4 2 a および 1 4 2 b が異なる場合、基板 1 4 1 の表面と合わせて 3 種類の表面が、結晶化領域に与えられる。

【0 0 4 1】

未知の生体高分子の結晶を調製する場合、初めは第 2 の基板の種類をなるべく

多くし、なるべく多くの物理的条件が存在する装置で結晶化実験を行うことができる。その実験で、ある 1 つの第 2 の基板でのみ結晶の成長が確認された場合、次に、当該第 2 の基板のみを複数使用した装置を用い、溶液の pH や濃度をより細かく変えた多数の条件下で結晶化実験を行うことができる。この手順によって、より適切な条件を探索することができる。

【0042】

例えば、図 10 に示す装置を使用する場合、まず初めに第 2 の基板として、図 13 (a) ~ (e) または上記 (1) ~ (5) を 1 枚ずつ使用する。その実験において、仮に基板 13 (d) または基板 (3) にのみ結晶成長が観測された場合、次に当該基板のみを 5 枚使用して、pH や濃度などの溶液の条件をより細かく変えて結晶化実験を行うことができる。

【0043】

図 19 (a) および図 19 (b) に本発明による装置の好ましい他の具体例を示す。結晶調製用装置 170 は、第 1 の基板 171 と、第 2 の基板 172 との組立体である。第 1 の基板 171 は、互いに離れて配置された 32 の円筒状貫通孔 173 を有する。貫通孔 173 の 1 つの開口は、基板 172 によってふさがれ、他の開口は、開けられたままである。基板 172 によってふさがれた貫通孔 173 は、結晶化すべき材料を含む溶液を保持する部分 174 を形成する。各溶液保持部 174 は、結晶化テストのためのウェルとなる。基板 172 は、図 20 に示すような形状を有する。基板 172 は、1 つの凸部 175 が 2 つの凹部 176 に挟まれた領域 177 を 32 有する。領域 177 は、貫通孔 173 の配列に対応して、配列されている。凸部 175 の表面と凹部 176 の表面とは、材質が異なり、そのため、両表面は、部分 174 において保持すべき溶液に対し、異なる表面電位（ゼータ電位）を有する。また、凸部 175 の先端の表面は、それを挟む 2 つの凹部 176 の表面より、顕著に狭くなっている。32 の領域 177 は、2 種類または 3 種類以上に分類される。すなわち、凸部 175 の表面と凹部 176 の表面との組合せは、32 の領域 177 おいて、2 種または 3 種以上存在する。たとえば、表面の組合せは、領域の列ごとに異なるものとすることができる。この場合、列の数、すなわち 8 種の組合せが存在する。一方、表面の組合せは、行ご

とに異なってもよく、この場合、4種の組合せが存在する。また、左側16と右側16の2種に分類してもよいし、32の領域がすべて互いに異なっているもよい。このように、用途に応じて任意の態様で、異なる組合せを配置できる。表面の組合せは、たとえば、図13(a)～(e)、図15(a)～(e)および上記(1)～(5)より選択できる。図20に示す第2の基板も、図14(a)～(c)に示すような膜形成、ホトリソグラフィー、エッチング等を経て、製造することができる。

【0044】

図21に示すように、装置170において、結晶化すべき高分子を含む溶液178は、部分174に保持される。この時、凸部175の表面と凹部176の表面は、同時に溶液178に接触し、そして、両表面は、異なるゼータ電位を溶液178中で示し、上述したような高分子の選択的吸着を可能にする。

【0045】

図19(a)および(b)に示す装置も、構造が異なる複数種の結晶化領域を有するので、同時に複数の結晶化条件を提供する。この装置は、32の結晶化用ウェルを提供する。従って、この装置の場合、最大で32種類の異なる条件下で同時に結晶化が行える。しかし、必ずしも全てのウェルを異なる条件にしなくてもよい。32のウェルのうち、結晶化領域の構造が同じ複数のウェルでは、pH、溶解するタンパク質の濃度等の条件を変えて、異なる条件下で結晶化を行うことができる。また、複数種のタンパク質溶液を、結晶化領域の構造が同じ複数のウェルにそれぞれ供給してもよい。一方、結晶化領域の構造が異なる複数のウェルは、はじめから、異なる結晶化条件を提供する。構造が異なる複数のウェルには、同じpH、または同じ濃度のタンパク質を供給することができる。この装置もまた、その性質が未知の生体高分子の結晶化を行う際、最適条件のスクリーニングに適している。

【0046】

しかし、図10に示すように複数の第2の基板と第1の基板とを組み合わせる方が、汎用性および柔軟性の点で好ましい。また、結晶化領域の種類が少ない基板の方が、より低いコストで製造できる。1枚のウエハに同種の第2の基板を多

数作製することで、多数の基板の製作に必要な成膜、ホトリソグラフィー、エッチング等の工程が少なくてすむ。

【0047】

上述してきた装置に関し、複数の貫通孔を有する基板（第1の基板）は、ガラス、ポリカーボネート樹脂、アクリル樹脂等のプラスチック類、ステンレス鋼等の金属などからなる。第1の基板は、溶液中の高分子の吸着を阻害し得る材料、たとえば低い等電点を有するガラス等で形成することが好ましい。ただし、高分子を吸着させる固体表面と囲い壁との距離が溶液中の高分子の拡散距離（高分子が溶液中で移動し得る距離）よりも十分に長い場合は、この限りではなく、他の材料でも問題ない。貫通孔は、レジストパターンを使用したエッチング、機械加工などにより基板に形成できる。また、原料の型成形等により、はじめから貫通孔を有する基板を得ることができる。結晶化領域を有する基板（第2の基板）は、半導体基板、特にシリコンウエハを用いて作製することが好ましい。シリコンウエハを用いれば、通常の半導体集積回路の製造技術を用いて、容易に複数種の表面を有する基板を作製することができる。すなわち、成膜技術、ホトリソグラフィー、エッチング、必要に応じて化学機械研磨（CMP）を用いて、容易に第2の基板を作製できる。基板上に形成される金属酸化物、金属窒化物等の層は、陽極酸化法、CVD等の蒸着などを使用して形成できる。

【0048】

第1の基板と第2の基板は、分離可能に接合してもよいし、分離不能に接合してもよい。分離可能に接合する場合、特定の第2の基板を、第1の基板からはずし、他の第2の基板に置き換えることができる。この場合、1つの第1の基板に対し、より多くの第2の基板を試みることができる。第1の基板と第2の基板とは、陽極接合法、または接着剤により、接合、固定することができる。ガラス基板と半導体基板とを接合する場合、陽極接合法が好ましく用いられる。一方、接着力のそれほど強くないシール剤または接着剤を使用して、後に分離できるよう、第1の基板と第2の基板とを合わせてもよい。また、嵌め合いの構造によって、他の材料を介さずに第1の基板と第2の基板を合わせてもよい。

【0049】

本発明によれば、第1の基板および第2の基板を含むキットも提供される。第1の基板に、適当な種類および／または数の第2の基板を組合わせて種々のキットを提供することができる。キットの使用者は、結晶の調製または結晶化のスクリーニングのため、適当な組合わせ体を適宜作製することができる。この場合、1つの第1の基板と組合わされる第2の基板の数は任意である。第1の基板の貫通孔の数に関わらず、第2の基板を多数組合わせてもよい。すなわち、第1の基板の貫通孔をすべてふさぐのに足る数よりも多い第2の基板を1つの第1の基板に組合わせてもよい。

【0050】

本発明による装置は、結晶化すべき高分子を含む溶液のpHを測定するための手段を含むことができる。上述したように固体表面および結晶化すべき分子の表面電位または実効表面電荷は、溶液のpHに左右されるため、結晶化の操作において、溶液のpHをモニタすることは、有意義である。pH測定手段には、通常のpHメーター、イオン感应性電界効果型トランジスタ（ISFET）と基準電極を組合わせた従来型のpHセンサー等を用いることができる。

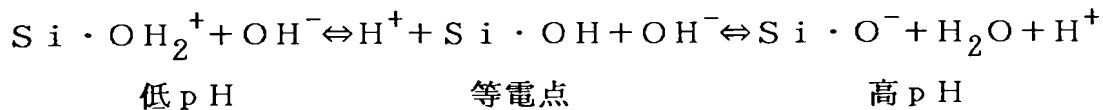
【0051】

一方、pH測定手段として、図22に示すような装置を用いてもよい。このpH測定手段は、半導体層と、半導体層上に形成される絶縁層と、溶液を絶縁層上で保持するための囲い壁と、溶液に接触するように囲い壁に設けられる金属電極とを備えることができる。pH測定装置100において、n型シリコン基板101上にはSiO₂膜102が形成されている。基板101上には溶液保持部110が設けられる。溶液保持部110は、溶液105の流れを堰きとめる囲い壁106およびSiO₂膜102から構成される。囲い壁106上には金属電極107が設けられる。金属電極107は、SiO₂膜102の方に延びていて、溶液保持部110内に保持される溶液と接触するように配置される。シリコン基板101の裏面（SiO₂膜102が設けられた面と対向する面）には、端子電極108が設けられる。

【0052】

酸化物の表面は、上述したように水和反応を起こして、水酸基を生成させる。

その水酸基の解離によって酸化物表面に電荷が生じる。したがって、酸化物の表面には、溶液の pH に応じた表面電位が発生する。たとえば、 SiO_2 の場合、以下のような解離がおこり、その表面電位は pH によって変化する。



他の酸化物でも同様な機構により表面電位が生じ、酸化物の種類に応じて等電点や発生する電位の値は異なる。なお、 SiO_2 の等電点はおよそ 1.8 ~ 2.8 である。また、詳細な機構は分からないが、窒化物の表面にも酸化物と同様に水溶液中でその水溶液の pH に応じた電位が発生する。たとえば、 Si_3N_4 の場合は等電点がおよそ 4 ~ 5 程度であって、それより低い pH で正の表面電位を、それより高い pH で負の表面電位を帯びる。このため、絶縁層として SiO_2 膜のかわりに Si_3N_4 膜等の窒化物膜を用いてもよい。

【0053】

したがって、図 22 に示す装置 100 において、 SiO_2 膜 102 が露出した溶液保持部 110 に水溶液を入れると、 SiO_2 膜 102 の表面にその水溶液の pH に応じた電位が発生する。この電位によって、酸化膜を介して設けられるシリコン基板表面のキャリア濃度が変化する。したがって、シリコン基板 101 の溶液 105 に近い部分に形成される空乏層 109 の容量が変化する（空乏層の幅が変化する）。したがって、MOS (MIS) に相当する構造を有する装置 100 において、金属電極 107 と端子電極 108 との間の容量電圧特性（高周波特性）は、溶液 105 の pH に応じて変化する。この変化を、図 23 に示す。図 23 は、pH の異なる 2 種の溶液に関して容量電圧特性を示している。容量電圧特性は、図に示すように pH に応じて電圧軸方向に変化する。

【0054】

あらかじめ、図 22 に示す pH 測定装置を用いて、測定周波数 1 MHz 程度で、pH の分かっている種々の溶液の容量電圧特性を測定し、pH 値とフラットバンド電位 (V_{FB}) との関係を得ることができる。pH 値とフラットバンド電位 (V_{FB}) は、たとえば図 24 に示すような関係を有する。この関係に基づいて、未知の溶液の pH が求められる。すなわち、pH 測定装置 100 を C-V メーター

およびC-Vレコーダーに接続する。次いで、溶液保持部110に測定すべき溶液を入れ、電極107と108との間のC-V特性を測定し、 V_{FB} を求める。得られた V_{FB} と、予め得られたpH値とフラットバンド電位(V_{FB})との関係から、当該溶液のpHが決定される。

【0055】

このpH測定装置において、n型Si基板の代わりにp型Si基板を用いてもよいし、他の半導体基板、たとえば、Ge基板やGaAs等の化合物半導体基板を用いてもよい。また、 SiO_2 膜の代わりに他の酸化物膜たとえば Al_2O_3 膜、 TiO_2 膜を用いてもよいし、 Si_3N_4 等の窒化物膜を用いてもよい。絶縁層の厚みは、たとえば100Å~1μmであり、好ましくは500Å~3000Åである。電極用の材料には、Pt、Pd、Au等を用いることができる。

【0056】

このpH測定装置は、極めて単純な構造(MOS(MIS)構造)を有し、通常の半導体加工技術(リソグラフィー、CVD、エッチング等)を用いて簡単に製作できる。当該装置の溶液保持部にピペットなどで溶液を滴下し、数μl~数十μlの微量の溶液についてpHを測定できる。この装置は、シリコン基板上に作製することができ、したがって、本発明による結晶調製装置と同じ基板上に作り込むことができる。たとえば、図10に示されるような装置の場合、5枚の第2の基板72のうちの1枚にこのpH測定装置を作り込むことができる。

【0057】

図25に示すように、装置230のウェルを透明なガラスの蓋200で密封し、冷暗所に保管することができる。各ウェルでの結晶成長の様子は、透明な蓋の上から顕微鏡により観察される。その際、図に示すように、pHモニター用セルの電極にC-Vメーター201を接続し、X-Yレコーダー202でC-V特性を測定する。これにより、結晶成長中の溶液のpHがモニターされる。

【0058】

本発明の装置は、沈殿剤とともに密封してもよい。沈殿剤は別の容器に入れて結晶成長用装置と並べて置けばよい。pHモニタは、必ずしも必要ではないが、同一の基板上に結晶成長用ウェル、pHモニター用セル、沈殿剤用セルを作製し

、1チップとした方が、使い勝手がよく好ましい。このような1チップ化した装置は、前述のように半導体装置の一般的な製造プロセスを用いて容易に作製できる。

【0059】

【実施例】

図10(a)および(b)に示す装置を用いて結晶化を行った。装置において、第1の基板は、約5cm×約3cmのサイズを有し、直径約4mmの貫通孔が25個形成された、厚さ約1mmのパイレックスガラス板であった。5つの第2の基板は、それぞれ以下の(A)～(E)であり、それぞれ、図13(a)～(e)に示す構造を有する。第1の基板と5つの第2の基板とは、陽極接合した。

(A) 約100Ωcmの比抵抗のp型シリコン表面に約5μmの深さでn⁺ドーピング層を形成した基板。

(B) 約10Ωcmの比抵抗のn型シリコンの表面に約5μmの深さでp⁺ドーピング層を形成した基板。

(C) 約100Ωcmの比抵抗のp型シリコン表面に約5μmの深さでn⁺ドーピング層を形成し、さらにその上に約100nmの厚みのSiO₂層を形成した基板。

(D) 約100Ωcmの比抵抗のp型シリコン表面に約100nmの厚みでSiO₂層を形成し、さらにその上に約100nmの厚みのSi₃N₄層を形成した基板。

(E) 約100Ωcmの比抵抗のp型シリコン表面に約100nmの厚みでSiO₂層を形成し、さらにその上に陽極酸化法によって約10μmの厚みのアルミナ層を形成した基板。

【0060】

(A)～(E)基板において、エッチングにより形成された凹部の深さは約100μmであり、タンパク質溶液と接触するシリコン表面の面積は約15mm²、凸部上面の面積は約0.3mm²であった。図に示すように各基板には結晶化領域が5つ設けられている。

【0061】

結晶化すべきタンパク質としてウシ肝臓カタラーゼを用いた。緩衝溶液には、以下の３種類を使用した。

(1) pH 5.2 : 0.1 M クエン酸 - 0.1 M Na_2HPO_4

(2) pH 8.0 : 0.1 M Na_2HPO_4 - 0.1 M KH_2PO_4

(3) pH 11.0 : 0.05 M ホウ酸 - 0.05 M KCl - 0.05 M Na_2CO_3

これらの緩衝溶液で濃度 30 mg/ml のカタラーゼ溶液を調製し、得られた溶液を 10 μ l づつ装置の各ウェルに滴下した。さらに各ウェルに NaCl を添加して、その濃度を 0.1 M とした。装置をカバーで覆い、各ウェルを 0.5 M の NaCl を含む沈殿剤とともに密閉し、4℃の温度で 10 日間放置した。その結果、pH 8.0 のサンプルでのみ、基板 (E) の表面に、約 0.5 mm のサイズの結晶が析出していることが確認された。

【0062】

【発明の効果】

本発明によれば、結晶化のため、より多くの条件を簡単な構造の装置において作ることができる。本発明によれば、タンパク質等の高分子の結晶を固体表面上に選択的に成長させることができる。また本発明によれば、X線構造解析を可能にし得る大型の結晶を得ることができる。さらに本発明によれば、多数の固体表面を結晶化に用いることによって、多数の種類の高分子の結晶化に対応する装置を提供できる。また、本発明では、微量の試料について結晶化を行なうことができる。

【0063】

本発明は、製薬産業や食品産業等において、種々の高分子化合物、特に高分子電解質を精製または結晶化するために用いることができる。本発明は特に、酵素および膜タンパク質等のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリサッカライド、核酸、ならびにこれらの複合体および誘導体等を精製または結晶化させるため好ましく適用される。特に本発明は、生体高分子の精製または結晶化のため好ましく適用される。また本発明の装置は、生体高分子等を選択的に吸着および固定化することが可能なため、バイオセンサ、バイオセンサによる各種生体組織お

よび生体物質の測定装置への応用等が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 蒸気拡散法による結晶化装置の一例を示す (a) 平面図および (b) X' - X' 断面図である。

【図 2】 本発明による装置の結晶化領域を示す概略断面図である。

【図 3】 溶液中の 2 種の固体表面およびタンパク質の表面電荷が、溶液の pH によって変化する様子を示す図である。

【図 4】 溶液中の 2 種の固体表面およびタンパク質の表面電荷が、溶液の pH によって変化する様子を示す図である。

【図 5】 いくつかの物質のゼータ電位の pH 依存性を示す図である。

【図 6】 (a) ~ (d) は、結晶化領域における種々の形状のアイランドを概略的に示す斜視図である。

【図 7】 (a) および (b) は、複数のアイランドが設けられた結晶化領域を示す斜視図である。

【図 8】 (a) ~ (c) は、結晶化領域において、複数の表面が配置されるパターンの例を示す平面図である。

【図 9】 本発明による装置において、複数の好ましい吸着表面を有する結晶化領域の一例を示す平面図である。

【図 10】 (a) は本発明による結晶調製用装置の一具体例を示す平面図であり、(b) はその X - X 断面図である。

【図 11】 (a) は図 10 (a) および (b) に示す第 2 の基板を示す平面図であり、(b) はその Y - Y 断面図である。

【図 12】 図 10 (a) および (b) に示す装置において、高分子を含む溶液が保持されている様子を示す断面図である。

【図 13】 (a) ~ (e) は、図 10 (a) および (b) に示す装置に使用される第 2 の基板の構造を模式的にそれぞれ示す断面図である。

【図 14】 図 13 (a) ~ (e) に示す基板を製造するための工程を示す概略断面図である。

【図 15】 (a) ~ (e) は、本発明による装置に使用される特定の結晶

化部材を模式的に示す断面図である。

【図 1 6】 (a) は、本発明による第 2 の基板の例を示す平面図であり、
(b) は、本発明により第 1 の基板と第 2 の基板を組合せた装置の例を示す断面図である。

【図 1 7】 (a) は、結晶化領域における表面の配置の一例を示す平面図であり、(b) は、その断面図である。

【図 1 8】 (a) は、結晶化領域における表面の配置のもう一つ例を示す平面図であり、(b) は、その断面図である。

【図 1 9】 (a) は、本発明による装置の他の具体例を示す平面図であり、(b) は、その Z-Z 断面図である。

【図 2 0】 図 1 8 (a) および (b) に示す第 2 の基板の平面図である。

【図 2 1】 図 1 8 (a) および (b) に示す装置において、高分子を含む溶液が保持されている様子を示す断面図である。

【図 2 2】 本発明の装置に設けられる pH センサーの一例を示す概略断面図である。

【図 2 3】 図 2 1 に示す pH センサーで測定される容量電圧特性の例を示す図である。

【図 2 4】 図 2 1 に示す pH センサーで測定される容量電圧特性から求められるフラットバンド値と溶液の pH との関係を示す図である。

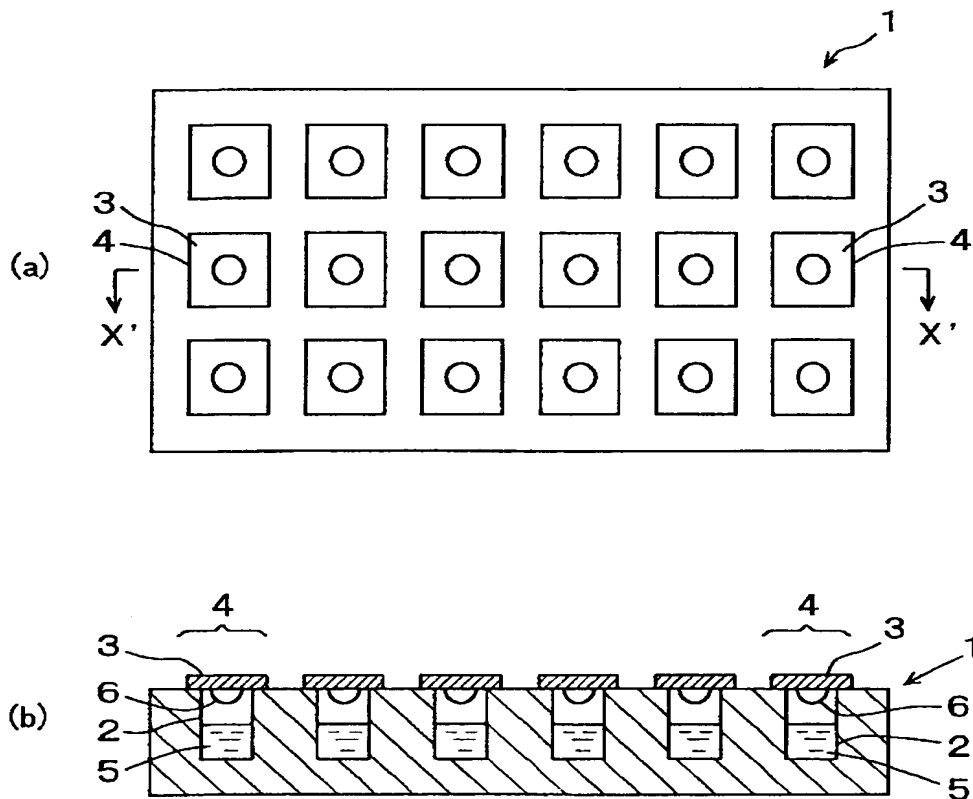
【図 2 5】 本発明による装置において pH を測定する流れを示す模式図である。

【符号の説明】

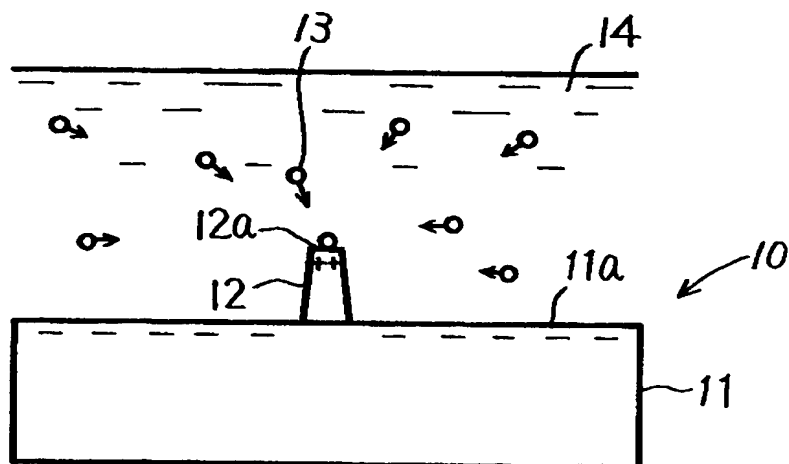
1 1 第 1 の固体、1 1 a 第 1 の表面、1 2 第 2 の固体、1 2 a 第 2 の表面、1 3 高分子、1 4 溶液、7 0, 1 7 0 結晶調製用装置、7 1, 1 7 1 第 1 の基板、7 2, 1 7 2 第 2 の基板、7 3, 1 7 3 貫通孔。

【書類名】 図面

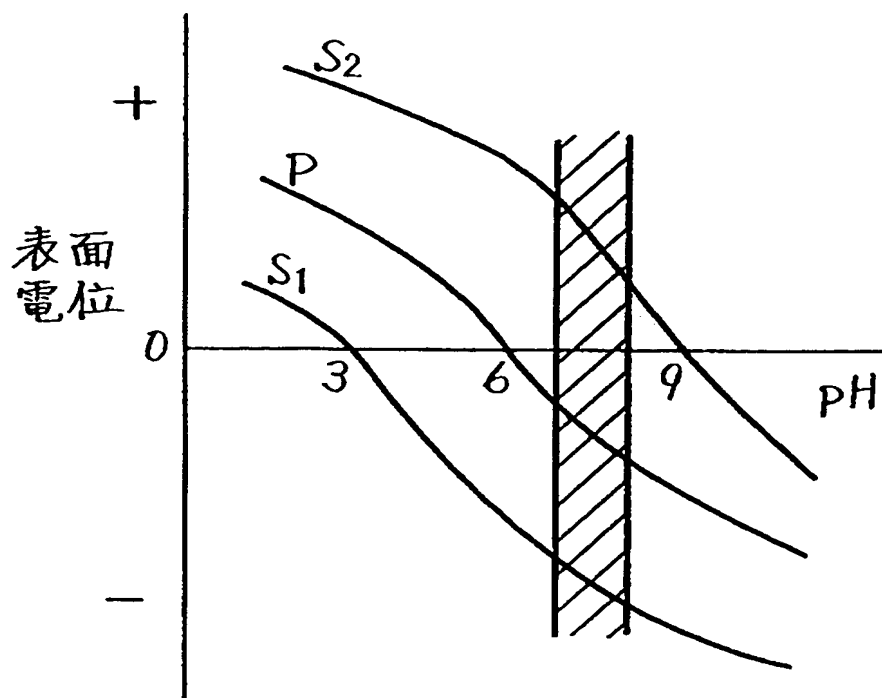
【図 1】



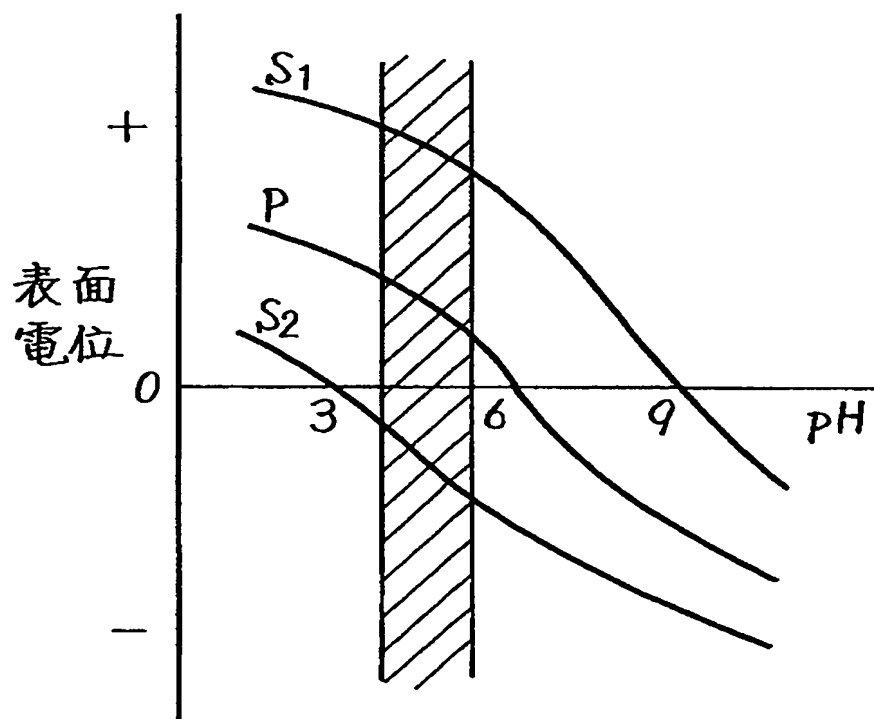
【図 2】



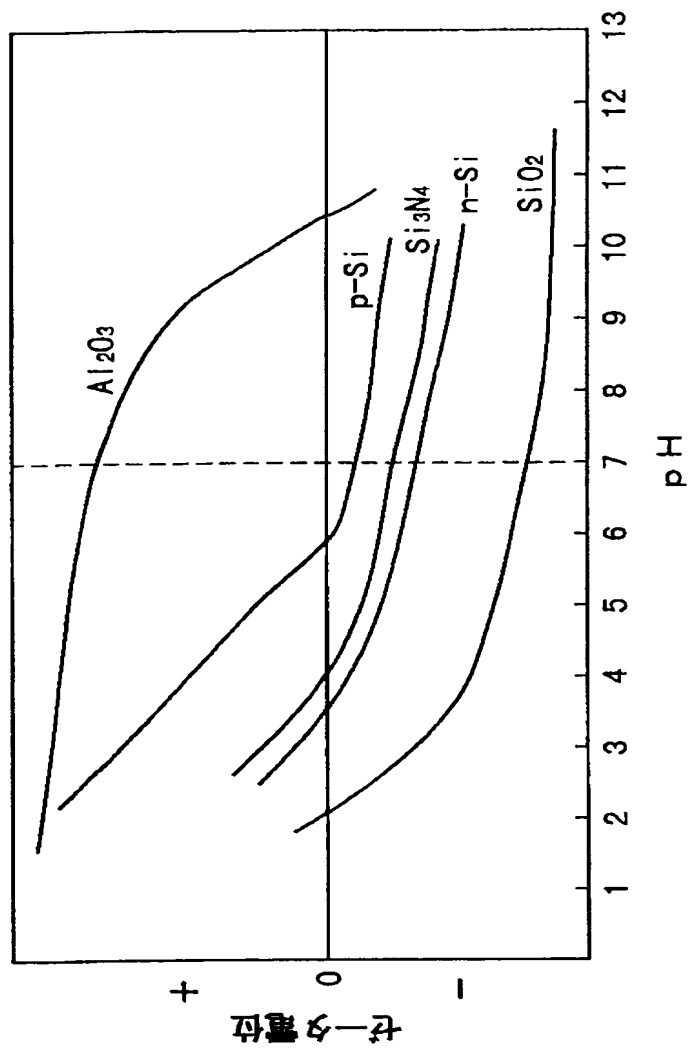
【図3】



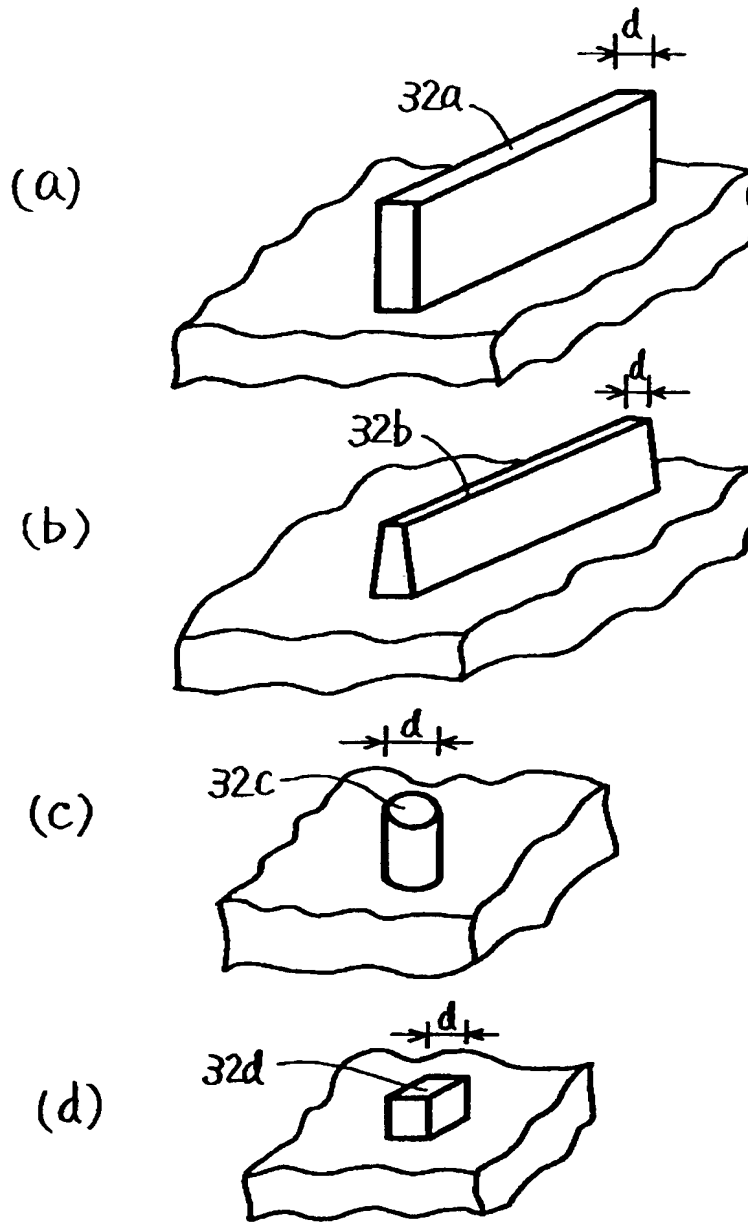
【図4】



【図 5】

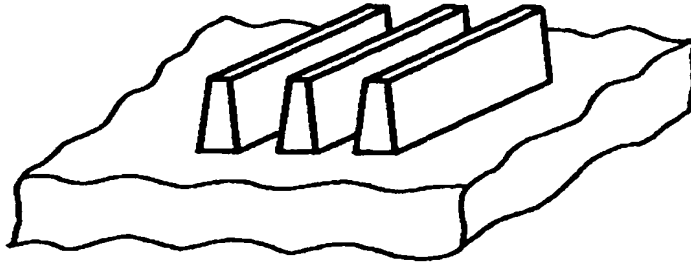


【図 6】

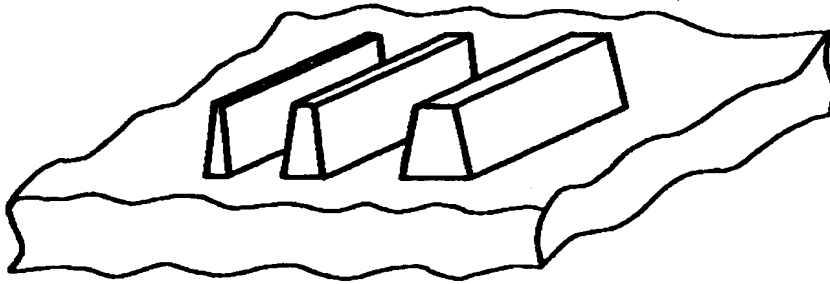


【図 7】

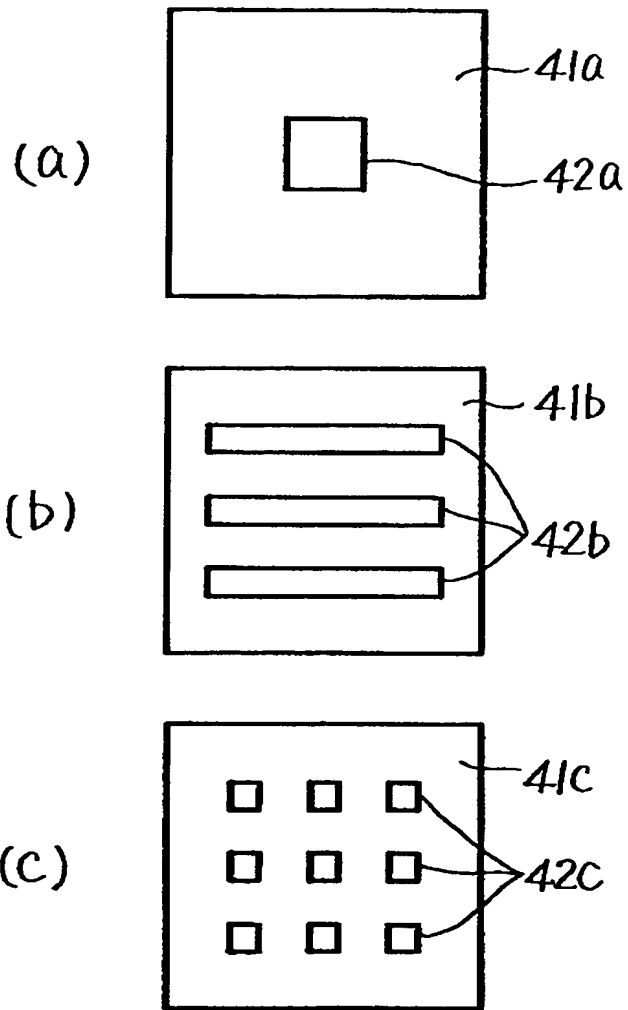
(a)



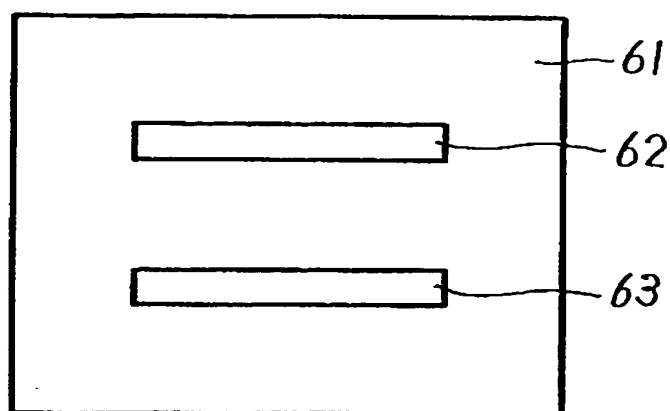
(b)



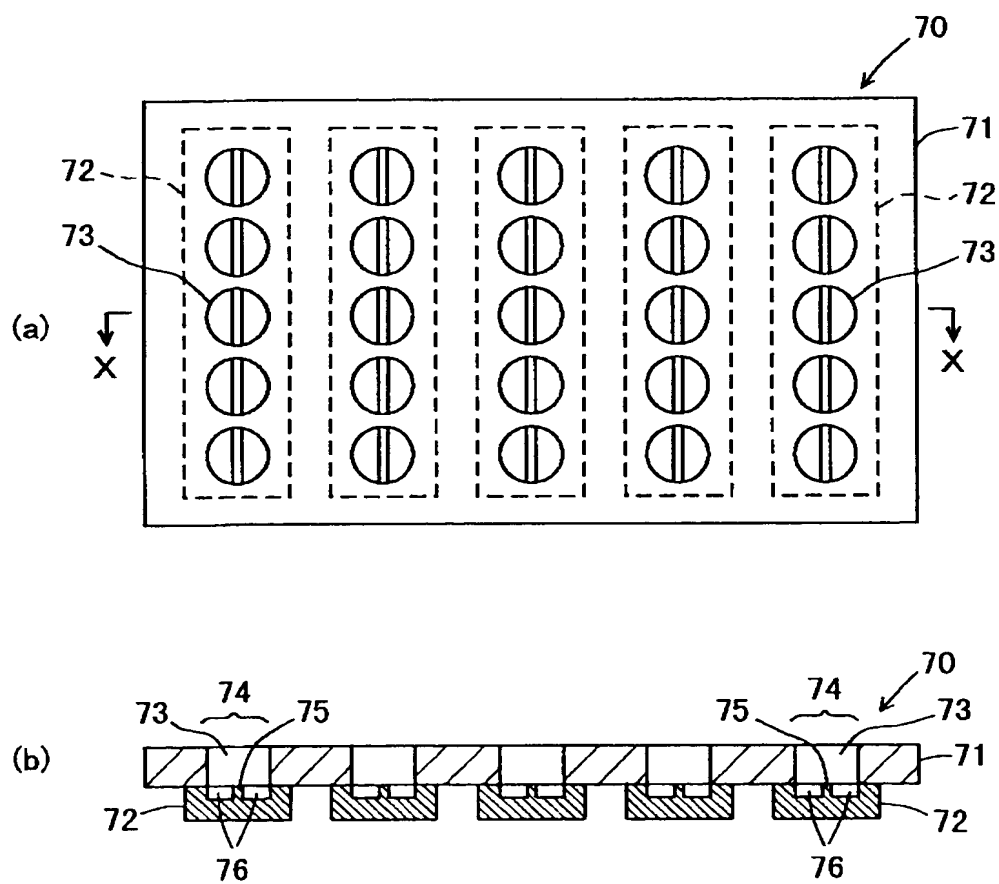
【図 8】



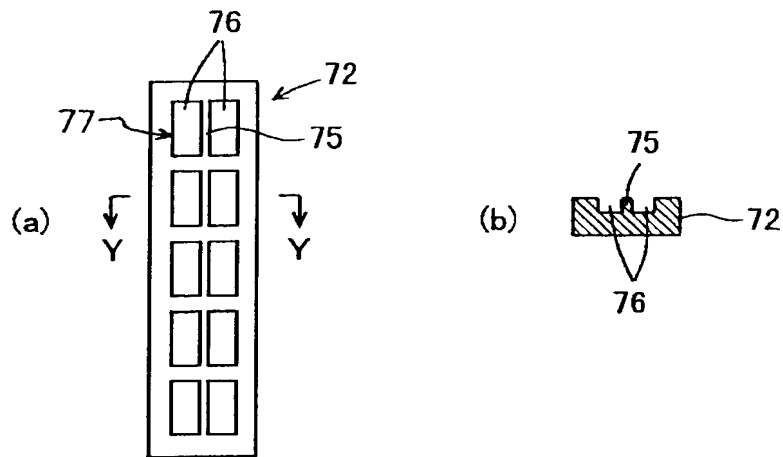
【図 9】



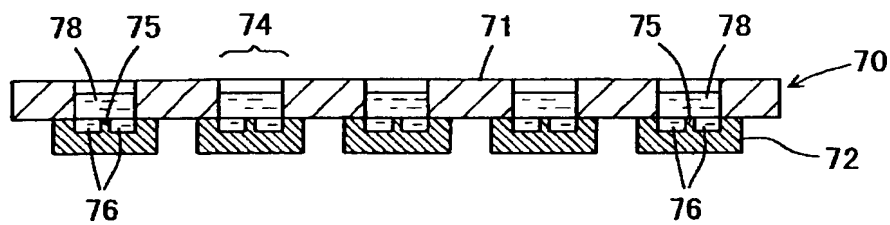
【図 1 0】



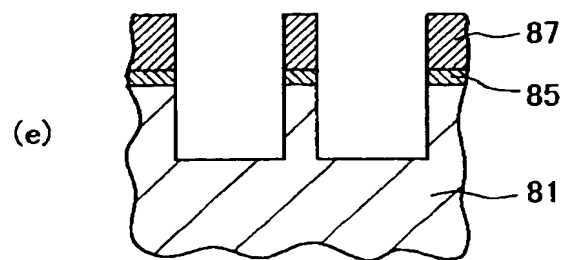
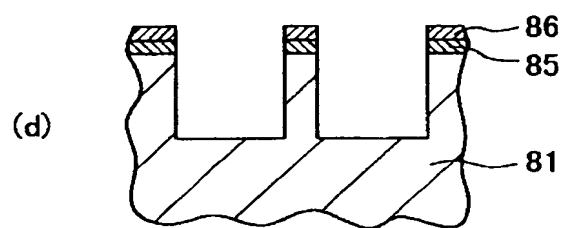
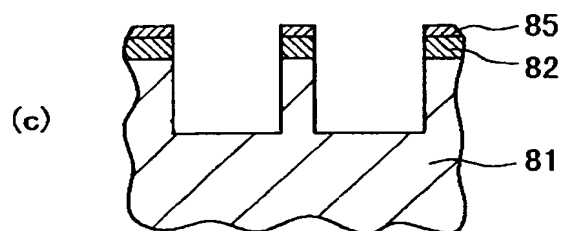
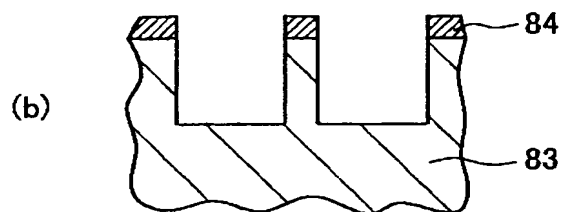
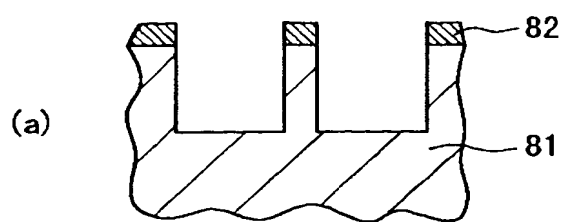
【図 1 1】



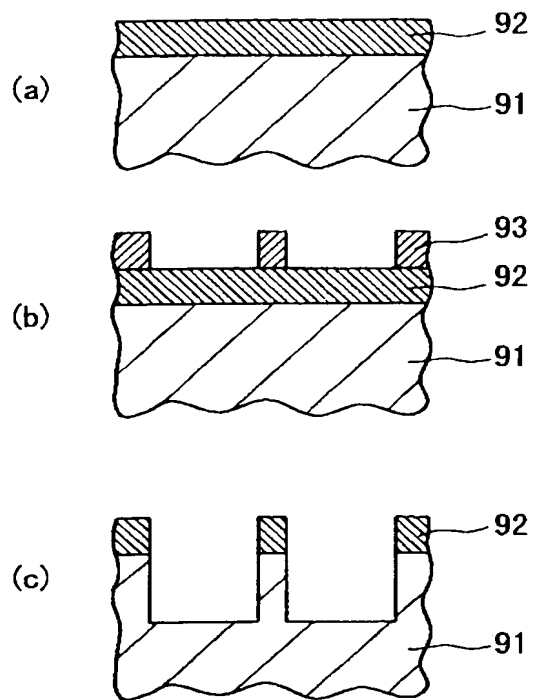
【図 1 2】



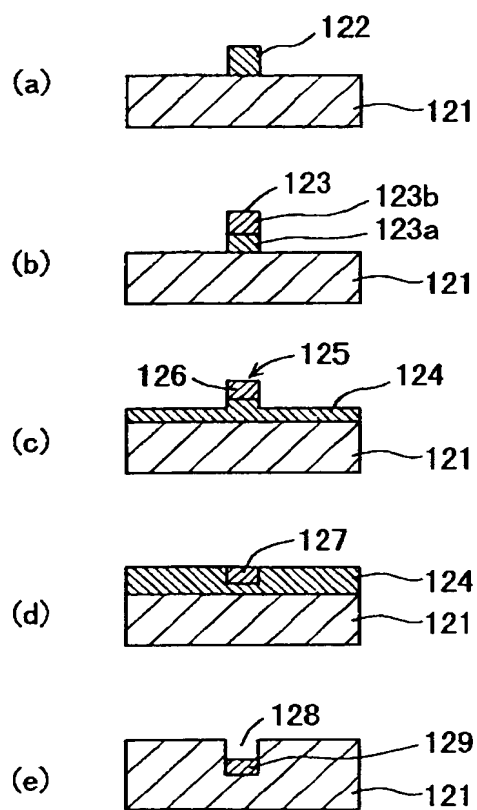
【図 1 3】



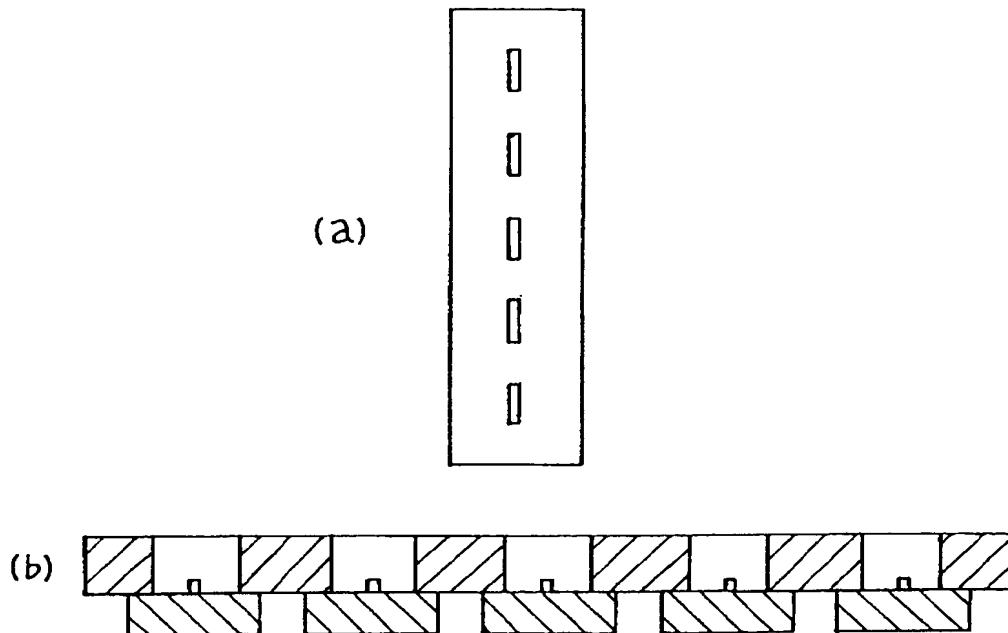
【図 1 4】



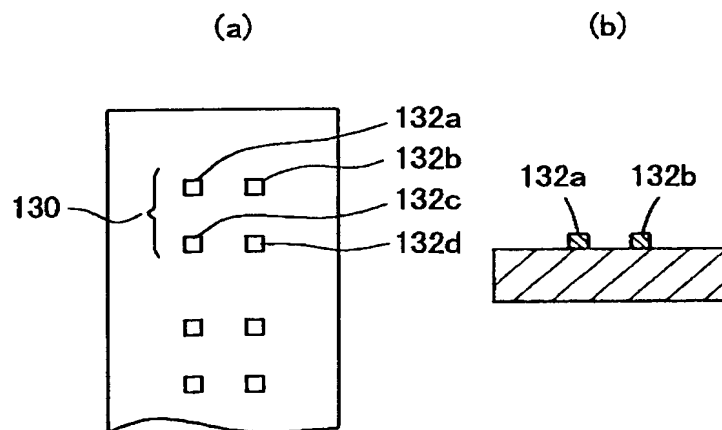
【図 1 5】



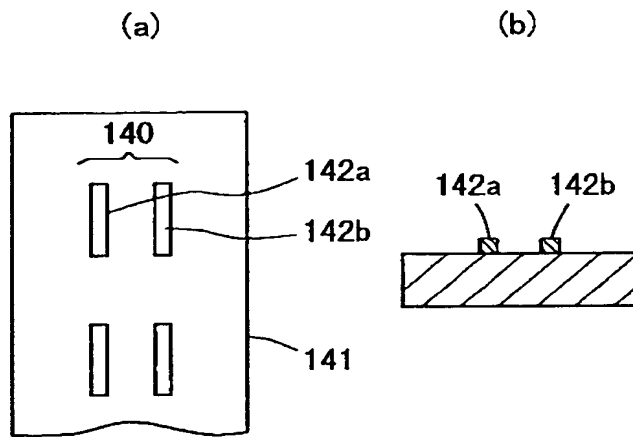
【図 1 6】



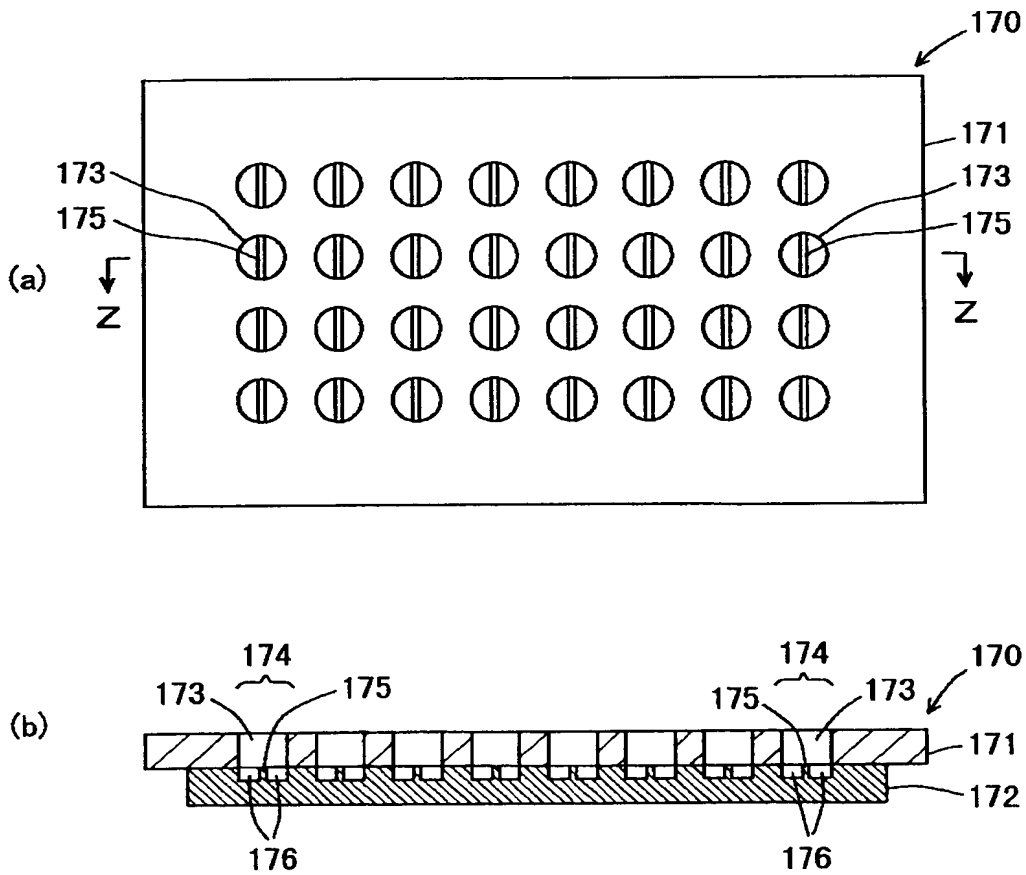
【図 1 7】



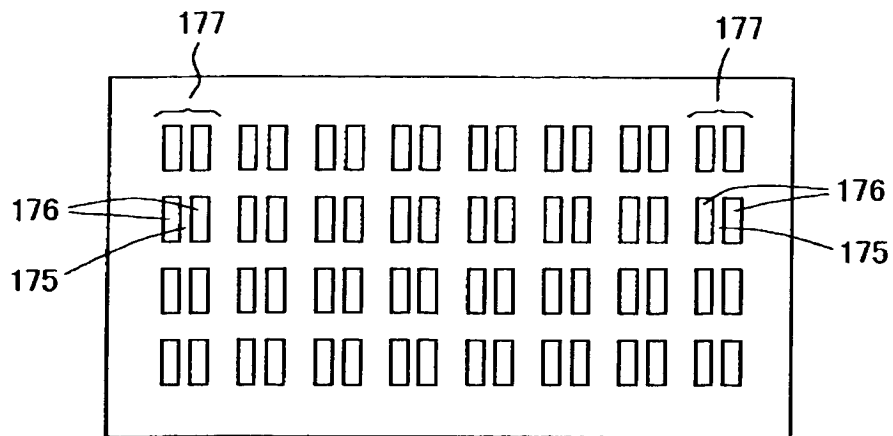
【図 1 8】



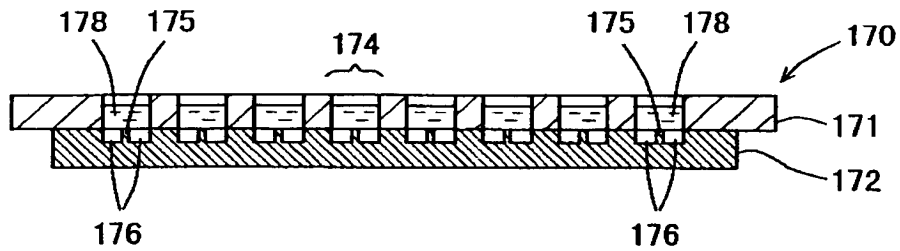
【図 1 9】



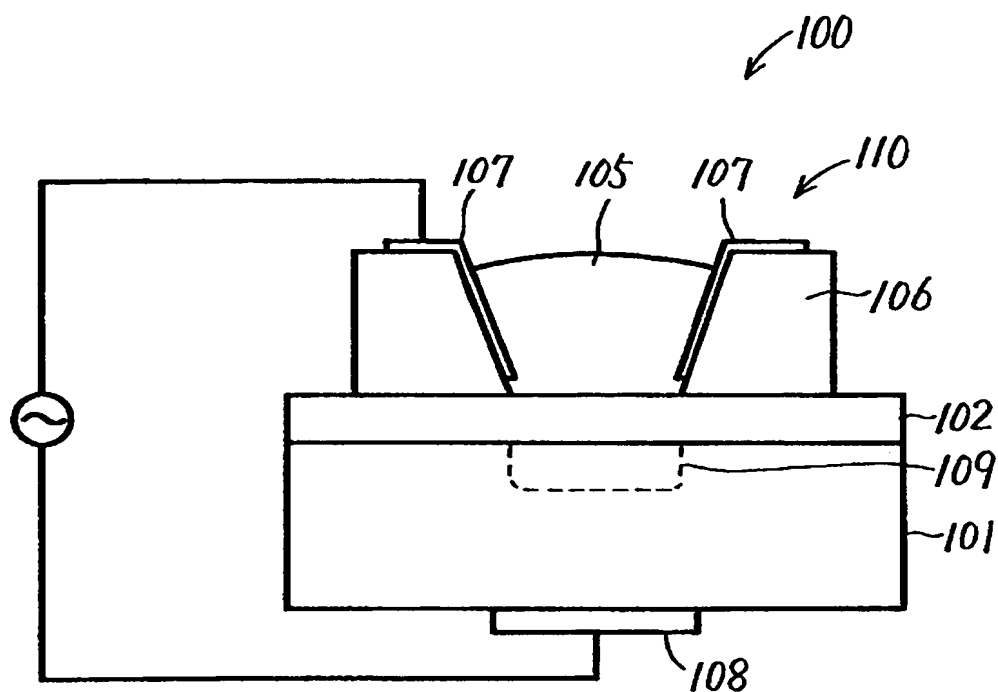
【図 2 0】



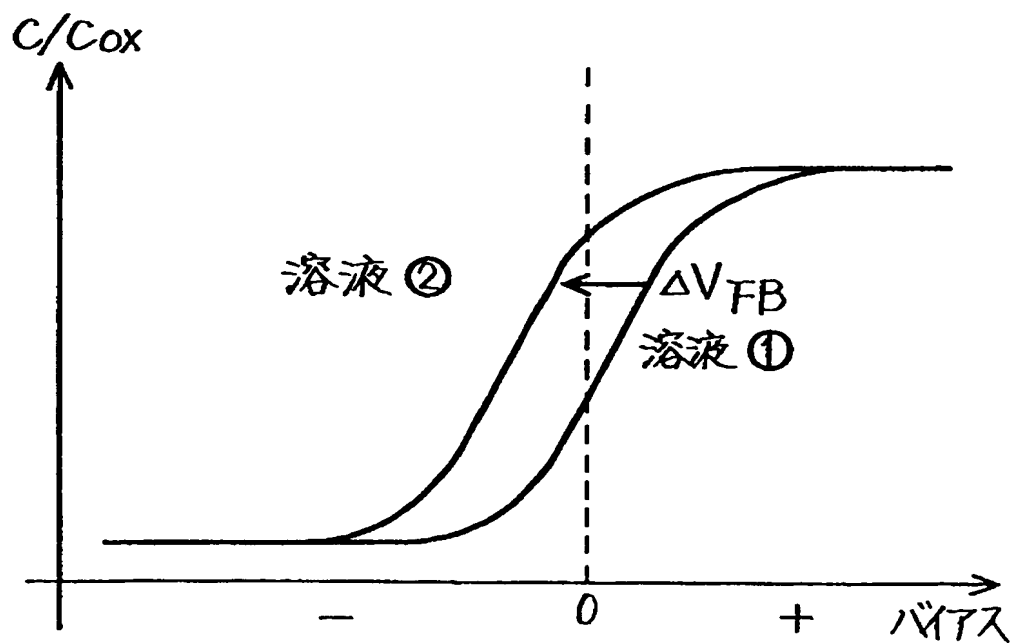
【図 2 1】



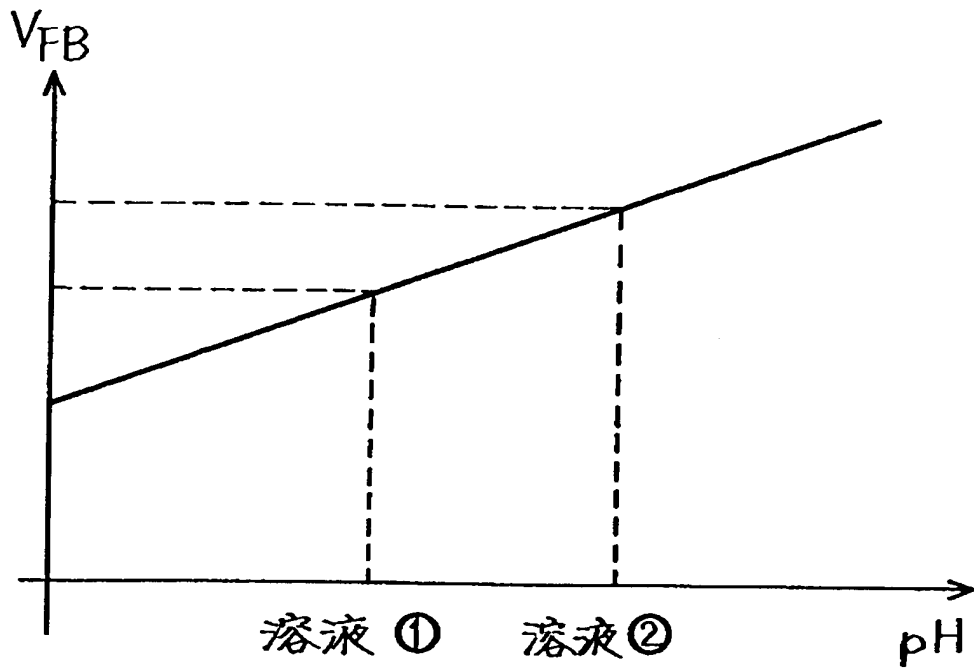
【図 22】



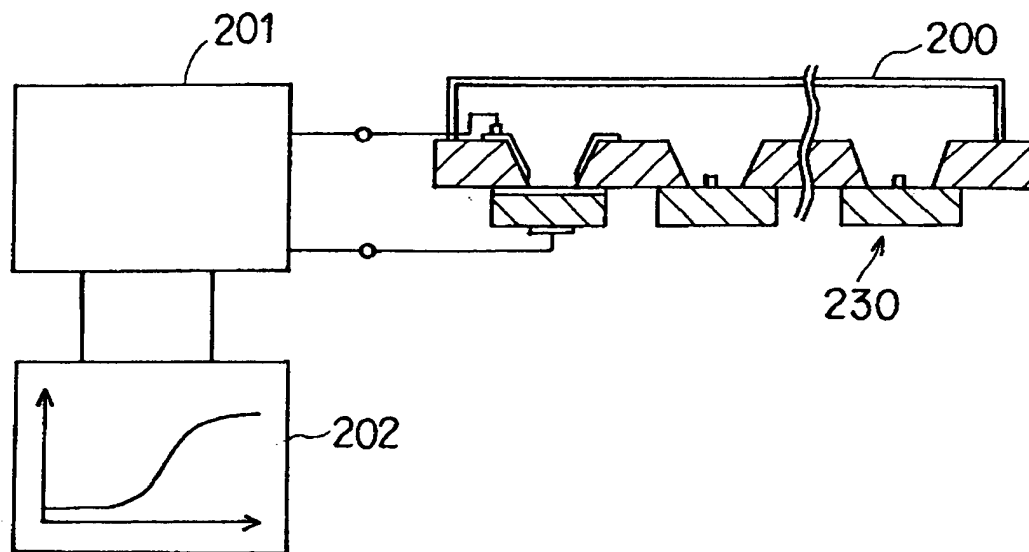
【図 23】



【図 24】



【図 25】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 種々の高分子の結晶化に適した条件をより短い時間でもたらし得るスクリーニング装置を提供することである。

【解決手段】 結晶調製用装置 7 0 は、複数の貫通孔 7 3 が互いに離れて設けられている第 1 基板 7 1、および高分子を含む溶液中で互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面をそれぞれ有する複数の第 2 基板 7 2 を備える。第 1 基板 7 1 の複数の貫通孔 7 3 をふさぐように、第 2 基板 7 2 が配置される。溶液を保持するための複数の部分 7 4 においてそれぞれ、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す複数種の表面が溶液に同時に接触できるように配置されている。

【選択図】 図 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002118]

1. 変更年月日	1990年 8月16日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
氏 名	住友金属工業株式会社

